

(54) METHOD FOR STABILIZING AMINOACYLASE SOLUTION

(11) 62-163689 (A) (43) 20.7.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-4795 (22) 13.1.1986
 (71) NAGASE SEIKAGAKU KOGYO K.K. (72) TAKEFUMI KOBAYASHI(3)
 (51) Int. Cl. C12N9/96

PURPOSE: To stabilize the titled solution useful for optical resolution of amino acid, etc. more convenient than powder with respect to production process and uses and to preserve it for a long period, by adding a small amount of borax and a zinc salt to an aminoacylase solution.

CONSTITUTION: An aminoacylase solution (water, etc., is used as a solvent and the concentration is preferably 1,000~15,000u/ml) is blended with 0.25~10% (w/v) (preferably 3~5%) borax and 0.05~2.0mM (preferably 0.05~1mM) zinc salt (e.g., zinc chloride, etc.,) and stabilized.

(54) PRODUCTION OF HUMAN PLASMIN- α_2 -PLASMIN INHIBITOR COMPLEX AND METHOD FOR SEPARATING SAME

(11) 62-163690 (A) (43) 20.7.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 60-284349 (22) 19.12.1985
 (71) TEIJIN LTD (72) YUKIYA KOIKE(5)
 (51) Int. Cl. C12N9/99, C12N9/68

PURPOSE: To form human plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex stably, by adding a specific drug to human blood or plasma and to separate human α_2 -plasmin inhibitor as human plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex efficiently, by bringing the reaction mixture into contact with a column and subjecting to gel filtration.

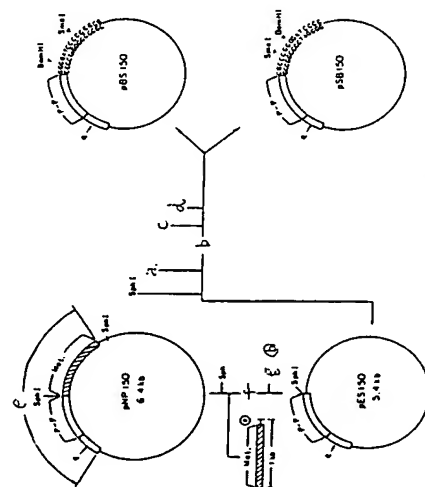
CONSTITUTION: Human blood or plasma is optionally blended with an inactivator of human- α_2 -macroglobulin and mixed with plasminogen activator to form human plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex. Then, the reaction mixture is brought into contact with a hydroxyapatite column and subjected to gel filtration so that human plasmin- α_2 -plasmin inhibitor complex is separated and collected.

(54) PRODUCTION OF HUMAN GROWTH HORMONE

(11) 62-163691 (A) (43) 20.7.1987 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-3499 (22) 13.1.1986
 (71) AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL (72) YOSHIO FURUYA(6)
 (51) Int. Cl. C12N15/00, C07H21/04, C12N1/20, C12P21/02// A61K35/74, A61K37/36(C12N1/20, C12R1:125)(C12P21/02, C12R1:07)

PURPOSE: To secrete human growth hormone on the outside of mold and to collect a large amount of human growth hormone from a supernatant liquid of culture solution, by transforming a bacterium belonging to the genus *Bacillus* with a recombinant DNA molecule and cultivating the prepared transformant strain.

CONSTITUTION: A DNA base sequence containing a gene to code human growth hormone is bonded to the downstream of a DNA base sequence containing a range participating in development of a gene of neutral protease of *Bacillus amyloliquefaciens* and in secretion of neutral protease produced as the result of the development. The DNA base sequence wherein both the DNA base sequences are linked is bonded to a plasmid replicable with a bacterium belonging to the genus *Bacillus* or a DNA sequence derived from the plasmid to replicate a recombinant DNA molecule. A bacterium belonging to the genus *Bacillus* is transformed with the molecule and cultivated to secrete a large amount of human growth hormone on the outside of mold.



a: polymerase, c: fragment of figure 4, d.g: ligase, e: neutral protease gene, f: large fragment

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-163689

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)7月20日

C 12 N 9/96

7421-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 アミノアシラーゼ溶液の安定化法

⑯ 特 願 昭61-4795

⑰ 出 願 昭61(1986)1月13日

⑱ 発 明 者 小 林 健 文 宝塚市安倉南1丁目1361番2号
⑱ 発 明 者 牧 吉 孝 京都府天田郡夜久野町畑2648
⑱ 発 明 者 本 田 末 広 宝塚市光ガ丘1丁目18番9号
⑱ 発 明 者 草 井 清 豊中市柴原町1丁目6番7号
⑲ 出 願 人 ナガセ生化学工業株式 大阪市西区新町1丁目1番17号
会社
⑳ 代 理 人 弁理士 安達 光雄 外1名

明 細 書

1. 発明の名称 アミノアシラーゼ溶液の安定化
法

2. 特許請求の範囲

1. アミノアシラーゼ溶液に、珪砂 0.25～1.0 % (w/v) および亜鉛塩 0.05 mM～2.0 mM を添加することを特徴とするアミノアシラーゼ溶液の安定化法。
2. 亜鉛塩が、水溶性亜鉛塩である特許請求の範囲第1項記載の安定化法。
3. 水溶性亜鉛塩が塩化亜鉛および硫酸亜鉛である特許請求の範囲第2項記載の安定化法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、アミノアシラーゼ溶液の長期保存を可能にするためのアミノアシラーゼ溶液の安定化法に関する。

(従来の技術)

アミノアシラーゼは溶液状態特に水溶液状態では、蒸質の存在しない条件下においては速や

かに変性し、失活していくため、現在市販されているアミノアシラーゼは粉体状態である。

しかしながらアミノアシラーゼを粉体状態にすることは先ず第一に酵素生産の際、液状から粉体にする工程において、塩析法、アルコール沈殿法等の酵素濃縮工程、および真空乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥等の乾燥工程を組合せる必要があり、更に粉碎、選別等の工程も加わるので工程が非常に長くなり、またこれらの工程を経由する間に自ら酵素活性の低下および収率の悪化が避けられず種々の問題がある。第二に、アミノアシラーゼの用途についてみると、この酵素はアミノ酸等の光学分割に使用されるが、バッチ法で光学分割する際、粉体のアミノアシラーゼはその都度溶媒に溶解して酵素液を調製する必要がある。また固定化酵素とする場合にも、その製造時に酵素粉体を一度溶媒に溶解した後、担体に吸着、結合、あるいは包括させて固定化酵素とする必要があり、何れにおいても一度はアミノアシラーゼ 末を溶液にする必要があつ

た。

このためアミノアシラーゼを液状即ち溶液の形で保存することが、上記粉体アミノアシラーゼの場合の欠点の克服、例えば工程の簡略化および前記用途面から見て便利ないし好都合であることは明らかである。しかしながら前述した如くアミノアシラーゼ溶液は不安定であり、保存することができない。このためアミノアシラーゼ溶液の安定化が望まれている。

従来蛋白質分解酵素の水溶液の安定化のためには種々の安定化剤が検討され提案されている。例えばソルビトール等の多価アルコール（特公昭37-16698号、特公昭40-10953号）、ゼラチン、カゼイン、エタノール、糖類等の組合せ（特公昭41-152号）、ソルビトールと礬砂との組合せ（特公昭53-28515号）等が報告されている。しかしながらこれら蛋白質分解酵素の安定化剤はアミノアシラーゼ溶液の安定化には効果がないか、あつても充分でない。

本発明におけるアミノアシラーゼ自体は、如何なる種類の起源からのアミノアシラーゼでも使用しうる。従つてその起源を限定するものではない。

本発明によるアミノアシラーゼ溶液を形成する溶媒としては一般に水が使用しうるが、有機溶媒例えばメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等の低級アルコールおよびソルビトール、エチレングリコール、グリセリン等の多価アルコール等も使用でき、またこれら有機溶媒の混合物および水との混合物も使用できる。

本発明によるアミノアシラーゼ溶液におけるアミノアシラーゼ濃度は任意の濃度でよく、一般には200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 30000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。アミノアシラーゼ溶液の濃度は、その遠心分離および取扱上の便利さの点から見て、また固定化酵素の調製のためには出来るだけアミノアシラーゼ溶液の酵素活性は高い方がより活性の高い固定化酵素を得やすいことから、好ましくは1000

〔発明が解決しようとする問題点〕

このためアミノアシラーゼの溶液製品は現在まで市販されておらず、また充分な検討がされていないのが現状である。なおアミノアシラーゼの力価測定時にコバルトイオンが活性の賦活効果があるため、使用されているにすぎない。

従つて本発明は溶液状態で長期保存可能なアミノアシラーゼ溶液を提供すること、即ち長期保存可能なアミノアシラーゼ溶液の安定化法を提供することにある。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者等は実用的な高い酵素濃度においても液状にて安定であるアミノアシラーゼ溶液について検討した結果礬砂と亜鉛塩の組合せを使用することによりアミノアシラーゼ溶液を安定化しうることをここに見出した。

従つて本発明はアミノアシラーゼ溶液に、礬砂0.25~10% (w/v) および亜鉛塩0.05 mM ~ 2.0 mM を添加することからなるアミノアシラーゼ溶液の安定化法にある。

~15000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。これらの濃度はそのアミノアシラーゼ溶液の使用目的に応じて例えばパッチ法にてアミノ酸等の光学分割に使用するときには約200~500 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 添加し、反応させる。また例えば固定化酵素調製の際に使用するときには、前記アミノアシラーゼ溶液1000~15000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を水にて適宜希釈して用い、固定化酵素1000~15000 μg を調製する。

本発明において使用する礬砂の濃度は溶液中0.25~10% (w/v) でよく、好ましくは3~5% (w/v) である。

本発明において使用する亜鉛塩としては塩化亜鉛、硫酸亜鉛等水および/または有機溶媒に溶解するものであれば任意の亜鉛塩を使用することができる。そしてその濃度は0.05 mM ~ 2.0 mM であり、好ましくは0.05~1 mM である。

なお本発明によるアミノアシラーゼ溶液は、使用するアミノアシラーゼに対する至適pHに調整するとよいことは勿論であり、このpH調整剤

としては塩酸、第一リン酸カリウム、第二リン酸ナトリウム等公知のものを使用できる。またアミノアシラーゼの賦活剤として公知のコバルト塩例えば塩化コバルト、硫酸コバルト、酢酸コバルト等も併用できる、また防腐効果をもたせるため殺菌作用、防腐作用を有する公知のものを使用したアミノアシラーゼに悪影響を与えぬ限り添加してもよい。

(作用)

上述した如く、本発明によればアミノアシラーゼ溶液に硼砂0.25～10% (w/v) および亜鉛塩0.05 mM～2.0 mMを添加してアミノアシラーゼ溶液を添加する。

硼砂添加量が0.25% (w/v) 未満のときは硼砂の防腐効果が弱くなり、またアミノアシラーゼの安定化効果も劣るため好ましくなく、また10% (w/v) を越えると硼砂の溶解度が低いため、アミノアシラーゼ溶液を調製することが困難なため好ましくない。

また亜鉛塩の添加量が0.05 mM未満ではアミ

ノアシラーゼの安定化効果が弱く、0.05 mM以上の添加量に比較して安定化効果が劣るため好ましくなく、また2.0 mMを超えて使用することは2.0 mMにて十分目的の安定化効果を得ることができ、それ以上使用しても安定化効果に特別の効果がないため好ましくない。

本発明によれば上述した如く硼砂と亜鉛塩とを併用するとアミノアシラーゼの溶液の長期安定化を達成することができ、何れか一方が欠けても目的の効果を達成できない。

アミノアシラーゼの活性は、アセチルDL-メチオニンを基質として、アセチルL-メチオニンを分解し、30分間1 μmolのL-メチオニンを遊離する活性を1単位とし、ニンヒドリン法で測定した。

(実施例)

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

実施例 1

硼砂10% (w/v) を含むpH7.2のアミノア

シラーゼ水溶液(アスペルギルス属から生産した)(初期アミノアシラーゼ活性4000 u/ml)に下表1に示す濃度の種々の金属塩を加え、40℃で1ヵ月および25℃で3ヵ月後のアミノアシラーゼの残存活性(%)を測定した。その結果を下表1に示す。賦活剤として硫酸コバルトを使用した場合も示した。

表 1 (その1)

実験 No.	添加金属塩		硫酸コバルト 濃度(mM)	残存活性(%)	
	種類	濃度(mM)		40℃1ヵ月後	25℃3ヵ月後
1	硫酸亜鉛	0	0	42	65
2	"	0	0.05	49	67
3	"	0	0.5	57	67
4	"	0.01	0	45	67
5	"	0.01	0.05	50	68
6	"	0.01	0.5	60	70
7	"	0.05	0	68	95
8	"	0.05	0.05	70	93
9	"	0.05	0.5	71	96
10	"	0.10	0	71	97
11	"	0.10	0.05	72	99
12	"	0.10	0.5	79	97

表 1 (その2)

実験 No.	添加金属塩		硫酸コバルト 濃度(mM)	残存活性(%)	
	種類	濃度(mM)		40℃1ヵ月後	25℃3ヵ月後
13	硫酸亜鉛	0.50	0	81	100
14	"	0.50	0.05	82	100
15	"	0.50	0.5	81	99
16	"	1.0	0	83	98
17	"	1.0	0.05	80	100
18	"	1.0	0.5	82	101
19	"	2.0	0	75	98
20	"	2.0	0.05	73	100
21	"	2.0	0.5	77	97
22	塩化カルシウム	0.5	0	46	53
23	"	0.5	0.05	52	60
24	"	0.5	0.5	54	65
25	"	1.0	0	54	60
26	"	1.0	0.05	47	65
27	"	1.0	0.5	41	64
28	硫酸マグネシウム	1.0	0	41	65
29	"	1.0	0.05	64	62
30	"	1.0	0.5	54	64
31	硫酸ニッケル	1.0	0	4	20
32	"	1.0	0.05	5	35
33	"	1.0	0.5	21	48

なお上記アミノアシラーゼ水溶液(4000 u/ml)に硼砂および金属塩の両者共含まぬ溶液の場合には、40℃、1カ月後および25℃、3カ月後の何れにおいても残存活性は0%であった。

上記表1の結果から硼砂と共に本発明による亜鉛塩を0.05~2.0mM加えたアミノアシラーゼ水溶液の40℃、1カ月後、25℃、3カ月後の残存活性が他のものよりすぐれていることが判る。

実施例 2

硼砂を0~10% (w/v)、硫酸亜鉛を0または0.5mM含有するpH7.2のアミノアシラーゼ溶液(アスペルギルス属から生産した)(初期アミノアシラーゼ活性5000 u/ml)を調製し、アミノアシラーゼ活性の40℃、1カ月後および25℃、3カ月後の残存活性を測定した。その結果を下表2に示す。

表 2

実験 No	添 加 成 分		残 存 活 性 (%)	
	硼砂 (% w/v)	硫酸亜鉛 (mM)	40℃、1カ月	25℃、3カ月
1	0	0	0	0
2	0	0.5	10	68
3	0.25	0	38	67
4	0.25	0.5	65	85
5	0.5	0	40	67
6	0.5	0.5	67	90
7	1	0	41	68
8	1	0.5	72	97
9	3	0	40	69
10	3	0.5	75	98
11	5	0	42	70
12	5	0.5	80	100
13	10	0	83	67
14	10	0.5	82	100

上記表2の結果から硫酸亜鉛と組合せて、硼砂を0.25~10% (w/v) 用いると残存活性がすぐれていることが判る。

(発明の効果)

本発明によればアミノアシラーゼ溶液の長期間にわたる保存が可能となり、従来の粉末アミノアシラーゼの製造工程を省略でき、かつその使用を簡単に行うことができる。

特許出願人 ナガセ生化学工業株式会社

代理人 安 端 光

同 安 通

